

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 279–281

Kurzhydrolyse von Östriolkonjugaten aus Schwangerenarn

Von P. A. M. Weiß

Universitäts-Frauenklinik (Lieferender Leiter Prof. Dr. E. Burghardt) Graz

Eingegangen am 5. November 1973/7. Februar 1974)

Es wird eine Kurzhydrolyse zur Spaltung von Östriolkonjugaten beschrieben. Nach deren Ausfällen aus Harn mit 700 g/l Ammoniumsulfat werden die Konjugate im doppelten Volumen an Wasser (bezogen auf die ursprüngliche Harnmenge) aufgenommen und mit 40 Vol% konz. Salzsäure 15 Minuten im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Die Östriolausbeute ist dabei im Mittel um 24% höher als bei der konventionellen Hydrolyse durch einstündiges Kochen des Harnes mit 15 Vol% Salzsäure unter Rückfluß. Wiederfindungsversuche mit ^{14}C -markiertem Östriol ergaben keine Zerstörung von Östriol bei der Kurzhydrolyse, jedoch 20% Östriolverluste bei der konventionellen Säurehydrolyse.

Es wird vermutet, daß eine Zerstörung von Östriol weniger durch Säureeinwirkung als durch destruiende Harnsubstanzen bewirkt wird. Durch die beschriebene Vorbereitung der Harnprobe zur Hydrolyse scheinen destruiende Substanzen weitestgehend ausgeschaltet zu werden.

Brief hydrolysis of oestriol conjugates from pregnancy urine

The cleavage of oestriol conjugates by brief hydrolysis is described. The conjugates are precipitated from urine with 70% (w/v) ammonium sulphate, dissolved in water (twice the original urine volume), and hydrolyzed by heating 15 minutes with 40% (v/v) conc. hydrochloric acid on a boiling water bath. With this procedure, the yield of oestriol is, on average, 24% higher than by the conventional hydrolysis, in which the urine is boiled under reflux for one hour with 15 vol% conc. hydrochloric acid. Recovery experiments with ^{14}C -labelled oestriol showed no destruction of oestriol in the short hydrolysis, but a 20% loss of oestriol in the conventional acid hydrolysis.

It is concluded that the destruction of oestriol is caused by destructive substances in the urine, rather than by the acid. These destructive substances appear to be largely excluded by the prior precipitation of the conjugates from the urine sample.

Bei Bestimmungen von Steroiden aus biologischem Material ist die Spaltung ihrer Konjugate zumeist derjenige Analysenschritt, der mit dem größten Zeitaufwand verbunden ist und der durch viele Unsicherheitsfaktoren belastet wird.

Bei der Bestimmung von Östrogenen wird entweder eine Säurehydrolyse oder eine enzymatische Hydrolyse durchgeführt.

Die enzymatische Hydrolyse ist teuer, schwer zu standardisieren (1) und mit einem Zeitaufwand von 1–5 Tagen verbunden (2). Die Bildung von hartnäckigen Emulsionen bei der Extraktion ist ein weiterer Nachteil der enzymatischen Hydrolyse. Auch eine enzymatische Kurzhydrolyse wurde beschrieben (3). Ihr Zeitaufwand beträgt zwar nur eine Stunde, die Ausbeute ist jedoch nicht quantitativ.

In den meisten Laboratorien wird zur Freisetzung von Östrogenen eine ein- bis zweistündige Hydrolyse des Harnes mit 15 Vol% konz. Salzsäure durchgeführt, deren optimale Methodik von verschiedenen Autoren genau festgelegt wurde (4, 5). Unter diesen Bedingungen wird jedoch ein nicht unerheblicher Anteil von Östriol zerstört.

Verschiedene Autoren konnten Östriolverluste von durchschnittlich 16% bzw. 41% feststellen (1, 6)

Tab. 1. Vergleich der Östrogenausbeute aus Schwangerenarn bei verschiedenen Hydrolysemethoden. Nach Adlercreutz und Luukkainen (6).

Hydrolysemethode	relative Ausbeute [%] an		
	Östron	Östradiol	Östriol
Säurehydrolyse	85	74	59
Gelfiltration + Säurehydrolyse	93	100	100
Gelfiltration + enzymatische Hydrolyse	100	95	95

(Tab. 1). Eigene Versuche zeigten zum Teil noch höhere Verluste (Tab. 2). Bei Glucose enthaltenden Harnen ist bekanntlich eine Säurehydrolyse der Östrogene im Harn wegen der destruienden Wirkung von Zucker völlig unzuverlässig (5).

Im Verlauf der weiteren methodischen Entwicklung wurde erkannt, daß durch eine Verdünnung des Harnes vor der Hydrolyse die Östriolausbeute besonders bei höheren Säurekonzentrationen wesentlich verbessert werden kann (5, 1). Eigene Versuche zeigten, daß bei einer sehr hohen Verdünnung des Harnes (1:50) die Östriolausbeute unter gleichen Hydrolysebedingungen

(15% konz. HCl, 60 Minuten, 100° C) wesentlich höher war als bei unverdünntem Harn (7) und auch um etwa 5% höher als bei enzymatischer Hydrolyse (Tab. 2).

Adlercreutz et al (6) konnten zeigen, daß die Säurehydrolyse der Östriolkonjugate nach deren Vorreinigung mit einer Sephadexsäule (8) der enzymatischen Hydrolyse überlegen ist. Es erfolgt dabei offenbar keine Destruktion der Östrogene (Tab. 1). Ihre Hydrolyseergebnisse nach Gelfiltration decken sich weitestgehend mit den eigenen Ergebnissen bei sehr hoher Verdünnung des Harnes (Tab. 2).

Aus allen diesen Beobachtungen kann der Schluß gezogen werden, daß eine Destruktion von Östriol bei der Säurehydrolyse erst durch das Zusammenwirken von Säure und unbekannten Harnsubstanzen zustande kommt. Bei der starken Verdünnung des Harnes von 1:50 vor der Hydrolyse kommen jedoch unhandliche Volumina zustande. Die Gelfiltration ist wiederum mit einem Zeitaufwand von vier Stunden behaftet. Es lag daher nahe, die erwähnten Nachteile durch die Kombination einer einfachen Vorreinigung der Konjugate mit einer geringen Verdünnung zu vermeiden.

Weiterhin wurde der Versuch unternommen, durch Erhöhen der Säurekonzentration die Hydrolysezeit zu verkürzen. Es wurde angenommen, daß nach der Ausschaltung von destruierenden Harnsubstanzen die Zerstörung der relativ säurestabilen Östrogene — nicht zuletzt wegen der kurzen Säureeinwirkung — ausbleibt.

Methodik

Untersuchungsmaterial

Harn von Schwangeren des letzten Trimenons

Reagenzien

p. a., Merck.

Hydrolyse

In 5 ml Harn werden 3,5 g Ammoniumsulfat vollständig gelöst. Dadurch werden Östriolkonjugate ausgefällt (9). Durch scharfes Zentrifugieren entsteht ein fester Niederschlag, von dem der Überstand durch vorsichtiges Abgießen entfernt wird. Die Zentrifugenröhrchen werden noch ungefähr eine Minute lang mit ihrer Öffnung schräg nach abwärts auf Zellstoff gelegt, damit Reste vom Überstand vollständig abfließen. Anschließend wird der Niederschlag in 10 ml Wasser aufgenommen und durch Rühren mit einem Glasstab gleichmäßig suspendiert. Nach Hinzufügen von 4 ml konzentrierter Salzsäure wird das Röhrchen unverschlossen 15 Minuten lang in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach 15 Minuten wird die Hydrolyse durch Abkühlen unter Fließwasser beendet und das Hydrolysat unverzüglich 3 mal mit 15 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die Weiterverarbeitung erfolgt je nach angewandter Bestimmungsmethode.

Tab. 2. Vergleich der relativen Ausbeute an Östriol bei normaler Säurehydrolyse, bei Säurehydrolyse nach Verdünnen des Harnes im Verhältnis 1:50 und bei enzymatischer Hydrolyse.

	Relative Ausbeute [%]	
	Unverdünnter Harn 15 Vol% konz. HCl	Verdünnter Harn 15 Vol% konz. HCl
Harn 1	68,2	100
Harn 2	41,0	100
Harn 3	33,0	100
Harnpool (Harn 1, 2 und 3)		100
Harnpool (Harn 1, 2 und 3)	18 h enzymatische Hydrolyse 66,2	
Harnpool (Harn 1, 2 und 3)	48 h enzymatische Hydrolyse 94,2	

Tab. 3. Vergleich der relativen Ausbeute an Östriol, 16-Epi-Östriol und Östetrol bei der konventionellen Säurehydrolyse des Harnes (15 Vol% konz. HCl, 1 Stunde Rückfluß) mit der Ausbeute bei der beschriebenen Kurzhydrolyse.

	Relative Ausbeute an Östriol	
	konventionelle Hydrolyse (15 Vol% konz. HCl, 1 h, 100° C)	Kurzhydrolyse (ausgefällte Konjugate, 40 Vol% konz. HCl, 15 min, 100° C)
Harn 4	82	100
Harn 5	70	100
Harn 6	79	100
Harn 7	76	100
Harn 8	81	100
Harn 9	70	100
Harn 10	62	100
Harn 11	86	100
Harn 12 + [4- ¹⁴ C] Östriol	80	100
Mittelwert	76	100
	Relative Ausbeute an 16-Epi-Östriol	
Harn 13	92	100
Harn 14	83	100
	Relative Ausbeute an Östetrol	
Harn 15	84	100
Harn 16	101	100

Ergebnisse und Diskussion

Beim Vergleich der Ergebnisse der herkömmlichen Säurehydrolyse (15 Vol% konz. HCl, 1 Stunde Rückfluß) und der beschriebenen Kurzhydrolyse konnte

festgestellt werden, daß die Ausbeute an Östriol bei der Kurzhydrolyse um $23,77 \pm 7,5\%$ ($n = 9$) höher war (Tab. 3).

Zur Überprüfung der Zerstörungsrate von Östriol wurden außerdem beide Hydrolysemethoden nach Zusetzen von $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol als Tracer durchgeführt. Zum Vergleich wurde $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol in Wasser gelöst und nach Ansäuern mit 15 Vol% konz. HCl denselben Extraktions-, Verteilungs- und Reinigungsschritten unterzogen (10). Bei der konventionellen Säurehydrolyse betrug der Verlust an Aktivität gegenüber dem Vergleichswert 20%, bei der Kurzhydrolyse jedoch konnten keine Verluste an Aktivität festgestellt werden.

Auch bei einigen anderen Östrogenen wurde die Ausbeute bei der Kurzhydrolyse stichprobenartig überprüft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 eingetragen.

Die Hydrolysezeit wurde mit einem Harnpool ausgetestet (Abb. 1). Im abgebildeten Diagramm wurde die Hydrolysezeit und die relative Ausbeute eingetragen. Sowohl bei 30 als auch bei 40 Vol% konz. Salzsäure war die gleiche Ausbeute an Östriol zu erzielen. Bei 40 Vol% konz. Säure war jedoch wie erwartet der Zeitaufwand zur maximalen Ausbeute geringer. Die quantitative Bestimmung von Östrogenen wurde mit einer chromatogrammspektrophotometrischen Methode durchgeführt (10).

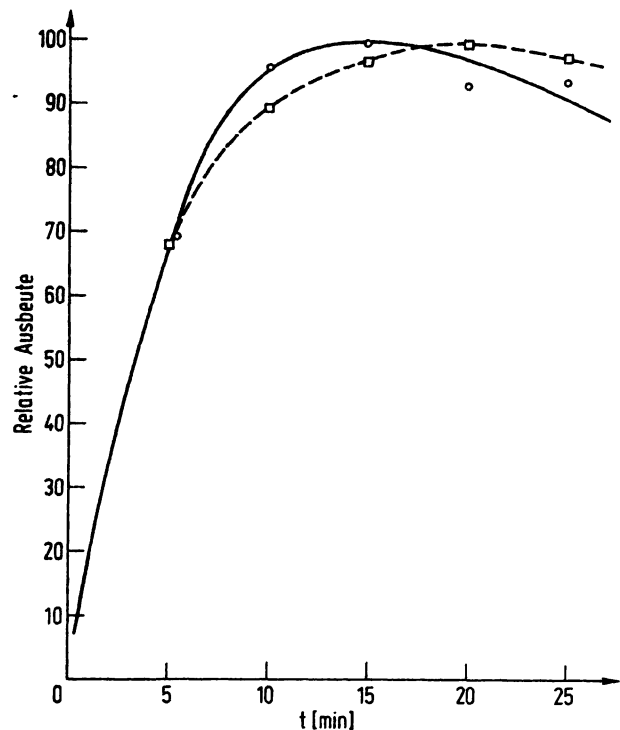


Abb. 1. Kinetik der Östriolfreisetzung bei der Säurehydrolyse mit 30 (□—□) und 40 (○—○) Vol% konz. Salzsäure (3 und 4 ml konz. HCl auf 10 ml Wasser). Die relative Ausbeute wurde gegen die Hydrolysezeit aufgetragen. Die durchgezogene Linie entspricht der Hydrolyse mit 40 Vol%, die unterbrochene Linie einer Hydrolyse mit 30 Vol% konz. Salzsäure.

Literatur

1. Frandsen, V. A. (1963), The excretion of oestriol in normal human pregnancy, S. 26–31, Verlag Munksgaard, Copenhagen.
2. Oertel, G. W. (1964), Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Harn, S. 8, Verlag Springer, Berlin–Göttingen–Heidelberg.
3. De la Torre, B., Johannison, E. & Diczfalusy, E. (1970), Acta Obstet. Gynec. Scand. 49, 165–170.
4. Marrian, G. F. & Bauld, W. S. (1951), Acta Endocrinol. (Copenhagen) 7, 240–256.
5. Brown, J. B. & Blair, H. A. F. (1958), J. Endocrinol. 17, 411–417.
6. Adlercreutz, H. & Luukkainen, T. (1960), in Gas phase chromatography of Steroids (Eik-Nes, Hornig, K. B., Hrsg.) S. 72–76 Verlag Springer, Berlin–Heidelberg–New York.
7. Weiß, P. A. M. (1972), Endocrinologie 59, 273–278.
8. Beling, C. G. (1963), Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. 79, 9–98.
9. Cohen, S. L. (1966), J. Clin. Endocrinol. Metab. 26, 994–999.
10. Weiß, P. A. M. (1970), Geburtsh. u. Frauenheilk. 30, 623–629.

Dr. P. A. M. Weiß,
Universitäts Frauenklinik
Graz